



(12)

(97)

Übersetzung der europäischen

PATENTSCHRIFT

Veröffentlichungsnummer: EP 0 547 151 B1

(96) Anmeldenummer: 91917276

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>: A61K 31/565  
A61P 3/04

(96) Anmeldetag: 28. 8.1991

(45) Ausgabetag: 26. 5.2003

(54) BEHANDLUNGSVERFAHREN ZUR FÖRDERUNG DES GEWICHTSVERLUSTES UNTER VERWENDUNG EINES  
SUBSTITUIERTEN DELTA-5-ANDROSTENS

(30) Priorität:

29. 8.1990 US 575156

(97) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

23. 6.1993, Patentblatt 93/25

(97) Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:

20.11.2002, Patentblatt 02/47

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A -0005636 EP-A -0246650 US-A -4897390  
EP-A -0133995 US-A -4518595 US-A -4898694  
PROC. SOUTH DAKOTA ACAD. SCI., VOL. 62, 1983, PAGES  
154-162, L.D. STABER ET AL 'EFFECTS OF DIETARY  
DEHYDROPIANDROSTERONE ON BODY WEIGHT AND FOOD  
CONSUMPTION IN LETHAL (AY/AW) AND WHITE-BELLIED  
AGOUTI (AW/AW) MICE (STRAIN 129/SV).'  
INT. J. OBES., VOL. 10, NO. 3, 1986, PAGES 193-204,  
M.P. CLEARY ET AL. 'ANTI-OBESEITY EFFECT OF TWO  
DIFFERENT LEVELS OF DEHYDROPIANDROSTERONE IN LEAN  
AND OBESE MIDDLE-AGED FEMALE ZUCKER RATS.'  
INT. J. BIOCHEM., VOL. 22, NO. 3, 1990, PAGES 205-210,  
M.P. CLEARY 'EFFECT OF DEHYDROPIANDROSTERONE  
TREATMENT ON LIVER METABOLISM IN RATS.'  
"ULTRA BURN" PRODUCT INFORMATION. THOMPSON MED.  
INC., USA

(73) Patentinhaber:

HUMANETICS CORPORATION  
18894 LAKE DRIVE EAST  
CHANHASSEN, MINNESOTA 55317 (US).

(72) Erfinder:

LARDY, HENRY, ARNOLD  
1829 THORSTRÅND ROAD  
MADISON, WI 53705 (US).

PARTRIDGE, BRUCE E.  
1209 SOUTH 25TH STREET  
LINCOLN, NEBRASKA 68502 (US).

T1  
ATE 227 992 T1

Anmerkung:

Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jeder beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß § 5 PatVEG vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Österreichischen Patentamt nicht geprüft!

### *Bereich der Erfindung*

Die Erfindung betrifft im allgemeinen die Verwendung von Steroiden zum Vollziehen einer gewünschten biologischen Reaktion. Im besonderen betrifft die Erfindung die Verwendung eines substituierten Dehydroepiandrosterons, das eine Vielzahl von vorteilhaften biologischen Reaktionen vollziehen kann, ohne die Bildung von Androgen- und Östrogenhormonen auszulösen, die gewöhnlich bei Behandlung mit Dehydroepiandrosteron auftritt.

### *Hintergrund*

Dehydroepiandrosteron ( $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -hydroxy,17-on) (im folgenden als DHEA) bezeichnet) ist ein natürliches Steroid, das in den Nebennieren, den Hoden und im Gehirn produziert wird. Dehydroepiandrosteron ist ein Zwischenprodukt bei der biosynthetischen Produktion von Östrogen und Androgen (Sexualhormonen) aus  $17\alpha$ -hydroxypregnanolon.

Es wird angenommen, daß eine Behandlung mit DHEA verschiedene biologische Reaktionen stimuliert und dabei auch die Gewichtsabnahme fördert und eine Erhöhung in der Produktion der Sexualhormone Androgen und Östrogen auslöst.

Es wird angenommen, daß das Vermögen des DHEA, die Gewichtskontrolle zu fördern, durch verstärkte Thermogenese (Umwandlung in Wärmeenergie und nicht in chemische Energie, beispielsweise zu ATP und/oder Triacylglyceriden), vermittelt wird. Es wird angenommen, daß die thermogene Wirkung des DHEA durch eine Simulierung bei der Synthese von thermogenen Leberenzymen entsteht, beispielsweise der mitochondrialen Glycerol-3-phosphatdehydrogenase (G3P-DH) und des Zytosolmaleinsäureenzyms (ME), die die Wirksamkeit des Energiestoffwechsels vermindern können.

Leider ist das DHEA nicht als therapeutisches Mittel zur Bekämpfung der Gewichtszunahme/Förderung der Gewichtsabnahme geeignet, da die Dosiermenge des DHEA, die zur Erzielung dieser gewünschtem Eigenschaften notwendig ist,

auch die Produktion von Sexualhormonen stimulieren kann, bei der verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen auftreten.

In US-A-4,898,694 werden Steroidpermutationen mit einer allgemeinen, sehr weiten Formel beschrieben, die beispielsweise als Krebs, Fettleibigkeit und Diabetes verhütende Mittel verwendet werden können. In dem gleichen Zusammenhang werden in EP 0 133 995 verschiedene Steroide und therapeutische Zusammensetzungen offenbart, die wiederum unter eine sehr weite allgemeine Formel fallen. In beiden Fällen kann bezweifelt werden, daß jede unter die Formeln fallende Substanz die in den Referenzdokumenten genannten Wirkungen aufweist.

Dementsprechend wäre ein therapeutisches Mittel, das die Gewichtsabnahmeeigenschaften des DHEA ohne die dabei auftretenden, die Sexualhormone stimulierenden Eigenschaften besitzt, äußerst nützlich.

#### *Zusammenfassung der Erfindung*

Ein Verfahren zur Bekämpfung der Gewichtszunahme und/oder zur Förderung der Gewichtsabnahme umfaßt die Schritte des Behandlens einer Person mit einer wirksamen, die Gewichtszunahme bekämpfenden und/oder die Gewichtsabnahme fördernden Menge eines substituierten  $\Delta^5$ -Androstens, das bei der Stimulierung der erwünschten biologischen Reaktion wirksam ist und beim Auslösen der Synthese von Sexualhormonen unwirksam ist.

Steroide, die die erwünschten vorteilhaften biologischen Ergebnisse liefern sollen, sind:

#### $\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol-7-on

sowie Derivate desselben, wobei (i) mindestens eine von den Hydroxylgruppen mit einer Säure verestert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus (i) aliphatischen C<sub>2</sub> bis C<sub>22</sub>-Säuren, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten können oder nicht und verzweigte Kohlenstoffketten enthalten können oder nicht, (ii) aromatischen C<sub>7-12</sub>-Säuren, (iii) C<sub>3</sub>- oder mehr- Dicarbonsäuren, wobei nur eine von den Carboxylgruppen an dem Steroid zu der/den Hydroxylgruppe(n) verestert

ist, wobei die zweite Carboxylgruppe frei oder in Form eines Salzes bleibt, oder (iv) anorganischen Säuren, beispielsweise Schwefelsäure und Phosphorsäure.

Diese Steroide können auch als Carbamat, Enanthate oder andere Derivate verabreicht werden, die das freie Steroid im Verdauungstrakt, im Blut oder in Geweben freisetzen können. Die erwünschte biologische Aktivität ist eine Funktion der Steroidkomponente. Die Derivierung der Komponente kann einer Vielzahl von möglichen Funktionen dienen, zu denen die Stabilisierung des Steroids, die Geschmacksgebung oder das Verdecken des natürlichen Geschmacks des Steroids oder die Beeinflussung der Absorptionsmenge des Steroids gehören.

*Ausführliche Beschreibung der Erfindung sowie  
eines besten Verfahrens*

$\Delta^5$ -Androstene, die an C-3, C-7 und/oder C-17 durch eine Hydroxyl- oder Ketogruppe substituiert sind, sind biologisch bei der Bekämpfung der Gewichtszunahme und der Förderung der Gewichtsabnahme ohne wesentliche Stimulierung bei der Produktion von Sexualhormonen wirksam. Derivate dieser substituierten  $\Delta^5$ -Androstene sind solche, bei denen mindestens eine von den Hydroxylgruppen mit einer Säure verestert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus (i) aliphatischen C<sub>2</sub> bis C<sub>22</sub>-Säuren, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten können oder nicht und verzweigte Kohlenstoffketten enthalten können oder nicht, (ii) aromatischen C<sub>7-12</sub>-Säuren, (iii) C<sub>3</sub>- oder mehr- Dicarbonsäuren, wobei nur eine von den Carboxylgruppen an dem Steroid zu der/den Hydroxylgruppe(n) verestert ist, wobei die zweite Carboxylgruppe frei oder in Form eines Salzes bleibt, oder (iv) anorganischen Säuren, beispielsweise Schwefelsäure und Phosphorsäure, wobei auch angenommen wird, daß sie die gewünschten Eigenschaften besitzen.

Diese Steroide können auch als Carbamat, Enanthate oder andere Derivate verabreicht werden, die das freie Steroid im Verdauungstrakt, im Blut oder in Geweben freisetzen können. Die erwünschte biologische Aktivität ist eine Funktion der Steroidkomponente; die derivierende Komponente kann zur Stabilisierung des

Steroids, zum Begünstigen oder zum Verzögern der Absorption oder zum Verdecken von dessen Geschmack dienen.

Synthese

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -ol 7, 17-dion,  
(7-Keto-DHEA)

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -ol, 7,17-dion kann synthetisch aus handelsüblichem DHEA-Acetat hergestellt werden durch sequentielle Synthesierung von:

$3\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -Androsten-17-on

$3\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -Androsten-7, 17-on

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -hydroxy-7, 17-on

$3\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -Androsten-17-on

$3\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -Androsten-7,17-on (7-on DHEA-Acetat) kann synthetisch hergestellt werden aus  $3\beta$ -Acetoxy- $\Delta^5$ -Androsten-17-on (DHEA-Acetat) durch Reaktion des DHEA-Acetats mit dem Oxidationsmittel  $\text{CrO}_3$  gemäß dem Verfahren, das dargelegt ist in Fieser, L.F., Jour. Am. Chem. Soc., Bd 75, S. 4386 – 4394 (1953).

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -hydroxy-7,17-dion (7-on DHEA) kann synthetisch aus dem 7-on-Acetat hergestellt werden und kann durch Verwendung der Entesterungs- und Reinigungsschritte gereinigt werden, die oben bezüglich der Synthese und der Reinigung von 7-Hydroxy-DHEA aus 7-Hydroxy-DHEA-Diacetat dargelegt wurden.

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol, 7-on,  
(7-Keto-Androstendiol)

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ , $17\beta$ -diol,-7-on kann synthetisch aus handelsüblichem Androstenedioldiacetat hergestellt werden durch sequentielle Synthesierung von:

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -dioldiacetat

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol-7-on diacetat

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol -7-on

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol-7-on diacetat kann synthetisch aus  $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -dioldiacetat (Androstendiol-Diacetat) hergestellt werden durch Reaktion des Androstendiol-Diacetats mit dem Oxidationsmittel CrO<sub>3</sub> gemäß dem Verfahren, das dargelegt ist in Fieser, L.F., Jour. Am. Chem. Soc., Bd 75, S. 4386 – 4394 (1953).

$\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol-7-on (7-on-Androstendiol) kann synthetisch aus  $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol-7-on diacetat hergestellt werden und kann durch Verwendung der Entesterungs- und Reinigungsschritte gereinigt werden, die oben bezüglich der Synthese und Reinigung von 7-Hydroxy-DHEA aus 7-Hydroxy-DHEA-Diacetat dargelegt würden.

Ohne uns dadurch ungebührlich einschränken zu wollen, nehmen wir an, daß das substituierte  $\Delta^5$ -Androsten weiter modifiziert werden kann, indem eine oder mehrere der Hydroxylgruppen mit einer von einer Vielzahl von organischen Säuren und anorganischen Säuren, beispielsweise mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure, verestert wird/werden.

#### *Behandlung*

Eine Person kann mit einer der gewöhnlich akzeptierten praktischen Verfahren, auch oral oder injiziert, mit dem substituierten  $\Delta^5$ -Androsten behandelt werden. Es wird angenommen, daß eine Behandlung mit einer Dosiermenge von etwa 0,1 bis 2 Gramm, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 2 Gramm, Steroid pro 100 Kilogramm Körpergewicht pro Tag im allgemeinen wirksam ist, um Gewichtsabnahme zu fördern und/oder Gewichtszunahme zu verhindern. Es wird angenommen, daß eine Dosiermenge von weniger als 0,1 Gramm pro 100 Kilogramm Körpergewicht im allgemeinen unwirksam ist, um Gewichtszunahme zu verhindern, während eine Dosiermenge von mehr als etwa 2 Gramm pro 100 Kilogramm Körpergewicht die

Kosten der Behandlung erhöht, ohne einen entsprechenden Vorteil in der Leistung zu erbringen. Die einer Person zu verabreichende optimale Dosiermenge ist fallspezifisch, da sich die optimale Dosiermenge nach mehreren Faktoren richtet, zu denen die derzeitige Körperzusammensetzung (Prozentsatz an Fett), die erwünschte Wirkung (Verhinderung von Gewichtszunahme kontra Gewichtsabnahme), die Eßgewohnheiten der Person (tägliche Kalorienaufnahme) und der gleichen gehören. Wie zu erwarten wäre, ist die zum Zwecke der Förderung von Gewichtsabnahme für eine Person vorgesehene Dosiermenge größer als diejenige, die zur Förderung der Gewichtserhaltung notwendig ist, wobei eine identische Kalorienaufnahme während jedes Programms angenommen wird.

Ohne uns dadurch ungebührlich einschränken zu wollen, nehmen wir an, daß die substituierten  $\Delta^5$ -Androstene Stoffwechselzwischenprodukte zwischen der Umwandlung des DHEA in ein Zwischenprodukt zwischen der Umwandlung des DHEA in (einen) Metaboliten sind, die tatsächlich für die Verstärkung der Produktion von thermogenen Enzymen verantwortlich sind, beispielsweise von Glycerol-3-phosphatdehydrogenase und von Maleinsäureenzym.

Die Person kann nach jedem gewünschten Zeitplan mit einem Steroid behandelt werden. Es ist vorauszusehen, daß das Steroid nicht nur dann zur Verhinderung von Gewichtszunahme und/oder zur Förderung von Gewichtsabnahme wirksam ist, während es in dem Körper aktiv vorhanden ist, sondern auch so lange, wie die Konzentration des/der eingebrachten thermogenen Enzyms/Enzyme erhöht bleibt. Gegenwärtig ist die Wirksamkeitsdauer des Steroids nicht vollständig erkannt. Es wird jedoch angenommen, daß das Steroid nicht im Körper gespeichert wird und innerhalb von Tagen nach dem Verabreichen im wesentlichen beseitigt and/oder entaktiviert wird. Dementsprechend sollte die Person bequemerweise jeden Tag auf optimale Leistung behandelt werden, kann jedoch auch weniger häufig, beispielsweise jeden zweiten Tag oder jede zweite Woche, behandelt werden, wenn weniger als die maximale Leistung hinnehmbar ist. Beispielsweise kann bei einer auf ein

Gewichtserhaltungsprogramm gesetzten Person eine Behandlung erforderlich sein, bei der die thermogenen Enzyme des Steroids nicht während des gesamten Zeitraums zwischen den Behandlungen erhalten bleiben, da durch die während der ersten paar Tage nach der Behandlung eintretende Gewichtsabnahme jede Gewichtszunahme ausgeglichen wird, die während der zwischen den Behandlungen verbleibenden Tage eintritt.

Wie aus den Faktoren, die sich auf Dosierung und Dosiermenge auswirken, zu erkennen ist, sollte jede spezielle Person sorgfältig und häufig inspiziert werden, und Dosierung und Dosiermenge sollten entsprechend der speziellen Situation geändert werden.

*Experimentelles*

*Beispiel I*

Synthese

Δ5-Androsten-3β-ol-7,17-dion

(Schritt 1) In einen 50 ml-Kolben, der mit einem magnetischen Rührwerk und einem Wasserbad ausgestattet war, wurden 6,5 ml Essigsäureanhydrid, 23 ml Essigsäure, 1,7 Gramm Natriumacetat und 2 Gramm DHEA-Acetat eingebracht, um eine erste Mischung zu bilden. Der ersten Mischung wurden während eines Zeitraums von dreißig Minuten 2 Gramm Chromtrioxid zugesetzt, um eine zweite Mischung zu bilden. Die erste Mischung wurde auf einer gleichbleibenden Temperatur von 56 - 58 °C gehalten und, während das Chromtrioxid zugesetzt wurde, kontinuierlich umgerührt. Die zweite Mischung wurde auf 56 - 58 °C gehalten und eine zusätzliche Stunde lang kontinuierlich umgerührt, wonach die zweite Mischung abgekühlt wurde und unter kontinuierlichem Umrühren langsam in 600 ml Eiswasser gegossen wurde, um ein Abscheideprodukt zu bilden. Das flockige Abscheideprodukt wurde auf einem Sinterglastrichter gesammelt und mit Wasser gewaschen, bis es nicht mehr grün aussah. Nach dem Trocknen im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> wurde das Produkt in Methanol gelöst und rekristallisiert, um im wesentlichen

reines  $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -acetoxy-7,17-dion mit einem Schmelzpunkt von etwa 191 – 192 °C zu ergeben.

(Schritt 2) Das Abscheideprodukt wurde in einem mit Dreifachhals und rundem Boden versehenen 1-Liter-Kolben, der mit einem magnetischen Rührwerk und Rücklaufkühler ausgestattet war, in 500 ml Methanol wieder löslich gemacht, um eine dritte Lösung zu bilden. Die dritte Lösung wurde unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre gebracht und unter beständigem Umrühren für den Rücklauf erwärmt. Der dritten Lösung wurden 250 ml einer 5 %-igen Lösung von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugesetzt, um eine vierte Lösung zu bilden. Die vierte Lösung wurde unter beständigem Umrühren 45 Minuten lang zum Rücklauf gebracht. Das Methanol wurde rotationsverdampft, und die wäßrige vierte Lösung wurde mit einer geeigneten Menge Eisessigsäure mit Sorgfalt auf einen pH-Wert von 7 gebracht. Die neutralisierte vierte Lösung wurde mit zwei 100 ml-Teilen Dichlormethan ausgezogen, die zwei Mengen wurden kombiniert, und das Dichlormethan wurde im Vakuum verdampft. Dann wurden die ausgezogenen Feststoffe zuerst mit wasserfreiem Ethanol und dann mit zwei getrennten Teilen Aceton azeotrop getrocknet. Die getrockneten ausgezogenen Feststoffe wurden mit Methanol versetzt, bis sich die Feststoffe vollständig gelöst hatten, um eine fünfte Lösung zu bilden. Die fünfte Lösung wurde mit Hexan versetzt, bis sich die Lösung zu trüben begann, und zu diesem Zeitpunkt begannen sich Kristalle von  $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -ol-7,17-dion bei Zimmertemperatur zu bilden.

Ein zweiter Anschuß von  $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ -ol-7,17-dion-Kristallen wurde durch Abkühlen der verbleibenden sechsten Lösung erhalten.

Das fertige Produkt wies einen Schmelzpunkt von etwa 235 – 238 °C auf.

### Synthese

#### $\Delta^5$ -Androsten- $3\beta$ , 17( $\beta$ )-diol-7-on

(Schritt 1) In einen 50 ml-Kolben, der mit einem magnetischen Rührwerk und einem Wasserbad ausgestattet war, wurden 6,5 ml Essigsäureanhydrid, 23 ml Essigsäure, 1,7 Gramm Natriumacetat und 2 Gramm Androstendiolacetat einge-

bracht, um eine erste Mischung zu bilden. Der ersten Mischung wurden während eines Zeitraums von dreißig Minuten 2 Gramm Chromtrioxid zugesetzt, um eine zweite Mischung zu bilden. Die erste Mischung wurde auf einer gleichbleibenden Temperatur von 56 - 58 °C gehalten und, während das Chromtrioxid zugesetzt wurde, kontinuierlich umgerührt. Die zweite Mischung wurde auf 56 - 58 °C gehalten und eine zusätzliche Stunde lang kontinuierlich umgerührt, wonach die zweite Mischung abgekühlt wurde und unter kontinuierlichem Umrühren langsam in 600 ml Eiswasser gegossen wurde, um ein Abscheideprodukt zu bilden. Das flockige Abscheideprodukt wurde durch einen Sinterglastrichter hindurch gefiltert und mit Wasser gewaschen, bis es nicht mehr grün aussah, und im Vakuum getrocknet.

(Schritt 2) Das getrocknete Abscheideprodukt wurde in einem mit Drei-fachhals und rundem Boden versehenen Ein-Liter-Kolben, der mit einem magnetischen Rührwerk und Rücklaufkühler ausgestattet war, in 500 ml Methanol wieder löslich gemacht, um eine dritte Lösung zu bilden. Die dritte Lösung wurde unter eine N<sub>2</sub>-Atmosphäre gebracht und unter beständigem Umrühren für den Rücklauf erwärmt. Der dritten Lösung wurden 250 ml einer 5 %-igen wäßrigen Lösung von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugesetzt, um eine vierte Lösung zu bilden. Die vierte Lösung wurde unter beständigem Umrühren 45 Minuten lang zum Rücklauf gebracht. Das Methanol wurde rotationsverdampft, und die wäßrige vierte Lösung wurde mit einer geeigneten Menge Eisessigsäure mit Sorgfalt auf einen pH-Wert von 7 gebracht. Die neutralisierte vierte Lösung wurde zweimal mit 100 ml-Teilen Dichlormethan ausgezogen, und der kombinierte Extrakt wurde im Vakuum verdampft. Dann wurden die ausgezogenen Feststoffe zuerst mit wasserfreiem Ethanol und dann zweimal mit Aceton azeotrop getrocknet. Die getrockneten ausgezogenen Feststoffe wurden mit Methanol versetzt, bis sich die Feststoffe vollständig gelöst hatten, um eine fünfte Lösung zu bilden. Die fünfte Lösung wurde mit Hexan versetzt, bis sich die Lösung zu trüben begann, und zu diesem Zeitpunkt begannen sich Kristalle von ΔS-Androsten-3β,17β-dion-7-on bei Zimmertemperatur zu bilden.

Das fertige Produkt wies einen Schmelzpunkt von etwa 200 – 202 °C auf.

*Beispiel II*

Protokoll zur Enzymaktivität

Verabreichung von Hormon: Es wurden Sprague-Dawley-Rattenmännchen mit einem Gewicht von 125 – 150 g von Sasco Inc. aus Oregon, WI, erworben. Die Ratten erhielten am ersten Tag nach dem Eintreffen freien Zugang zu Wasser und zu Purina-Rattenfutterpellets Am zweiten Tag begann die Verabreichung der Steroide. Die Steroide wurden entweder oral (kombiniert mit dem Purina-Rattenfutter) verabreicht oder in der in Tabelle 6 dargestellten Weise 6 Tage lang intraperitoneal injiziert.

Herstellung von Lebermitochondrien und von Zytosol. Die behandelten Ratten wurden nach 6 Behandlungstagen durch Köpfen getötet. Die Lebern wurden herausgeschnitten und in 10 ml einer aus 250 mM Manitol, 70 mM Saccharose und 3 mM Hepes (im folgenden MSH-Pufferlösung) mit einem pH-Wert von 7,4 bestehenden Pufferlösung gegeben, wurden gewogen, aus der Pufferlösung entnommen, mit einer Schere zerstückelt, mit dem MSH-Puffer gewaschen, in dem MSH-Puffer in einem Verhältnis von 1 Gramm zerstückelter Leber zu 5 ml MSH-Puffer suspendiert und mit einem Elvehjem-Rotationshomogenisator homogenisiert.

Der Mitochondrienanteil wurde mit dem Verfahren hergestellt, das beschrieben ist in Johnson, D. und Lardy, H.A., Methods Enzymology, Bd. 10, S. 94 - 96 (1967), das hiermit durch Verweis darauf einbegriffen ist. Kurz gesagt, das Leberhomogenat wurde g 10 Minuten lang in einer Beckman-Zentrifuge des Modells J2-21 mit einem Rotor JA-20 mit 750 zentrifugiert, und die fertige überstehende Lösung wurde mit 15 000 g weitere 10 Minuten lang zentrifugiert. Die fertigen Mitochondriepellets wurden zweimal mit MSH-Pufferlösung gewaschen, wieder in 0,8 bis 1 ml einer wäßrigen Glycerollösung von 35 Gew.% suspendiert und bei -70 °C aufbewahrt.

Der Zytosol-Anteil wurde durch erneutes Zentrifugieren der früher zentrifugierten überstehenden Lösung 30 Minuten lang mit 10 000 g in einer Beckmann-Ultrazentrifuge des Modells L2 mit einem Rotor Typ 40 gewonnen. Die fertige überstehende Lösung wurde bei -70 °C aufbewahrt.

Die Protein-Konzentrationen in den fertigen Präparaten wurden mit dem Biuret-Verfahren bestimmt, das beschrieben ist in Layne, E., Methods Enzymology, Bd. 3, S. 450-451 (1957), das hiermit durch Verweis darauf einbegriffen ist. Kurz gesagt, die Protein-Konzentrationen wurden durch Behandlung einer verdünnten Proteinlösung mit Kupfertartratlösung und Messung der optischen Dichte mit 540 nm bestimmt.

Enzymversuche. Die Mitochondrienaktivität GP3-DH wurde mit dem Verfahren bestimmt, das beschrieben ist in Wernette, M.E., Ochs, R.S. und Lardy, H.A., J. Biol. Chem., Bd 256, S. 12767 – 12 771 (1981), das eine modifizierte Version des Verfahrens ist, das beschrieben ist in Gardner, R.S., Anal. Biochem., Bd. 59, S. 272 – 276 (1974). Beide Referenzdokumente sind hiermit durch Verweis darauf einbegriffen. Kurz gesagt, es wurden Teilmengen der früher hergestellten Mitochondrien mit einem Gehalt von 0,1 bis 0,2 mg Protein in einem Reagenzglas, das 50 mM sn-Glycerol-3-P, 50 mM Kaliumphosphat (pH-Wert 7.0), 1 mM KCN und 0,2 % p-Iodonitrotetrazoliumviolett in einer Gesamtmenge von 0,4 ml enthielt, 30 Minuten lang bei 37 °C bebrütet. Die zu bebrütenden Mitochondrien wurden während der Bebrütungszeit kontinuierlich mit einem Dubnoff-Schüttelgerät umgerührt, das mit 100 Zyklen/min umgerührt wurde. Die Bebrütung wurde durch Eingeben von 0,6 ml von 1M Essigsäure in das Reagenzglas beendet. Das während der Bebrütungszeit entstandene Iodoformazan wurde in 2 ml Ethylacetat ausgezogen, was durch Einbringen des Ethylacetats in das Reagenzglas, gründliches Mischen und anschließendes Dekantieren des Ethylacetats mit dem Iodoformazan darin aus dem Reagenzglas geschah. Die optischen Dichten des Iodoformazans mit Ethylacetatschichten darin wurden mit 490 nm mit Hilfe eines Spektrometers Cary-15, Version

4.08, des Modells 3820 Data System, eines Online-Instrumentensystems abgelesen. Zur Berechnung der Enzymaktivitäten wurde ein Extinktionskoeffizientenwert von  $2.01 \times 10^4 / (\text{M cm})$  für das Produkt Iodoformazan in Ethylacetat verwendet.

Die Enzymaktivität in dem Maleinsäurezytosol wurde gemäß dem Verfahren gemessen, das beschrieben ist in Hsu, R.Y. und Lardy, H.A., Methods Enzymol., Bd. 8, S. 230 - 235 (1967). Kurz gesagt, es wurden Teilmengen des früher hergestellten Zytosols mit einem Gehalt von 0,1 bis 0,5 mg Protein in einem Reagenzglas, das 0,8 mM Malat, 67 mM Triethanolaminpufferlösung (pH-Wert 7,4), 4 mM MnCl<sub>2</sub> und 0,2 mM NADP in einer Gesamtmenge von 1 ml enthielt, 3 Minuten lang bei 26 °C bebrütet. Das zu bebrütende Zytosol wurde während der Bebrütungszeit kontinuierlich mit einem Dubnoff-Schüttelgerät umgerührt, das mit 100 Zyklen/min umgerührt wurde. Die Aktivität des Maleinsäureenzyms wurde aus der Veränderungsgeschwindigkeit der optischen Dichte errechnet, die 0,5 bis 2 Minuten lang mit 340 nm mit einem Spektrometer Cary-15, Version 4.08, des Modells 3820 Data System, eines Online-Instrumentensystems gemessen wurde.

Die Ergebnisse mehrerer Tests, die gemäß dem oben aufgestellten Protokoll ausgeführt wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt.

#### Ansprüche

1. Biologisch aktives Steroid, das zur Verhinderung einer Gewichtszunahme bei einer Person wirkt, ohne im wesentlichen die Synthese von Sexualhormonen zu fördern, mit einem Steroid, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Derivaten von Δ5-Androsten-3β, 17β-diol-7-on, die das freie Steroid im Verdauungstrakt, im Blut oder in Geweben freisetzen können.

2. Biologisch aktives Steroid nach Anspruch 1, wobei mindestens eine von den Hydroxylgruppen von  $\Delta 5$ -Androsten- $3\beta$ , 17 $\beta$ -diol-7-on mit einer Säure verestert wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus (i) aliphatischen C<sub>2</sub>- bis C<sub>22</sub>-Säuren, (ii) aromatischen C<sub>7-12</sub>-Säuren, (iii) C<sub>3</sub> oder mehr-Dicarbonsäuren, wobei nur eine von den Carboxylgruppen an dem Steroid zu der/den Hydroxylgruppe(n) verestert ist, oder (iv) anorganischen Säuren.
3. Biologisch aktives Steroid nach Anspruch 1, das als Carbamat oder Enantat vorgesehen ist.
4. Biologisch aktives Steroid nach den Ansprüchen 1 - 3 zum Verhindern einer Gewichtszunahme bei einem Säugetier, insbesondere einem Menschen.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung, die zum Verhindern einer Gewichtszunahme bei einer Person wirksam ist und der Person mit üblichen Praktiken verabreicht werden kann, mit  $\Delta 5$ -Androsten- $3\beta, 17\beta$ -diol-7-on oder Derivaten desselben, die das freie Steroid im Verdauungstrakt, im Blut oder in Geweben freisetzen können, und mit jeder weiteren für die gewählte Verabreichungsweise notwendigen Substanz.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, vorgesehen zum Verhindern einer Gewichtszunahme bei einem Säugetier, insbesondere einem Menschen.
7. Verwendung eines Steroids, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $\Delta 5$ -Androsten- $3\beta$ -hydroxy-7, 17-dion und Derivaten desselben, die das freie Steroid im Verdauungstrakt, im Blut oder in Geweben freisetzen können, zur

Herstellung eines Produkts zum Verhindern einer Gewichtszunahme, ohne im wesentlichen die Synthese von Sexualhormonen zu fördern.

8. Verwendung eines Steroids, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Derivaten von  $\Delta 5$ -Androsten-3 $\beta$ -hydroxy-7, 17-dion, wobei mindestens eine von den Hydroxylgruppen mit einer Säure verestert wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus (i) aliphatischen C<sub>2</sub>- bis C<sub>22</sub>-Säuren, (ii) aromatischen C<sub>7-12</sub>-Säuren, (iii) C<sub>3</sub> oder mehr-Dicarbonsäuren, wobei nur eine von den Carboxylgruppen zu der/den Hydroxylgruppe(n) an dem Steroid verestert ist, oder (iv) anorganischen Säuren, zur Herstellung eines Produkts zum Verhindern einer Gewichtszunahme, ohne im wesentlichen die Synthese von Sexualhormonen zu fördern.
  
9. Verwendung eines Steroids, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Derivaten von  $\Delta 5$ -Androsten-3 $\beta$ -hydroxy-7, 17-dion, wobei das Derivat als Carbamat oder Enantat vorgesehen ist, zur Herstellung eines Produkts zum Verhindern einer Gewichtszunahme, ohne im wesentlichen die Synthese von Sexualhormonen zu fördern.

Verwendung eines Steroids, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $\Delta 5$ -Androsten-3 $\beta$ -7 $\alpha$ -17-triol oder  $\Delta 5$ -Androsten-3 $\beta$ -7,17-triol, zur Herstellung eines Produkts zum Verhindern einer Gewichtszunahme, ohne im wesentlichen

Tabelle 1  
(Einbringen von Enzymen in die Leber von Ratten mit C19-Steroiden)

Steroide	Menge in %	Gew.-% Steroid im Futter	G3P-DH (Kontr.-%)	Maleinsäureenzym (Kontr.-%)
(DHEA)	1 29 27 12	0,2 0,1 0,05 0,01	380 265 251 139	512 --- 394 337
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -ol-17-on	3 2 2	0,05 0,05 0,033	292 308 117	64 423 118
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -ol-17-on	3 2	0,1 0,1	220 220	350 449
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -ol-17-on	3 5	0,05 0,0575	439 224	341 229
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ -ol-7,17-on	2 3 3	0,01 0,115 0,115	183 261 91	447 121 611
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ -ol-7,17-onacetat	3	0,1	227	108
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ -ol-7-methyl-17-on	2	0,01	99	1030
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 17 $\beta$ -triol	2	0,1	286	305
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol-7-on	3 4	0,05 0,01 0,01 0,13	360 180 232 173	175 452 119
$\Delta^5$ -Androsten-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol-7-onadiacetat	2	0,01		

Bei

<sup>1</sup> Kontrollaktivität beruht auf Aktivität der Enzyme in der Leber von Ratten, die mit dem Viehfutter ohne Ergänzung durch Hormone gefüttert wurden. Bei jedem Versuch wurden die nur mit dem Viehfutter ohne Ergänzung durch Hormone gefütterten Ratten mit Versuchsrasen verglichen, die mit Viehfutter gefüttert wurden, das mit den angegebenen Gew.-% Hormon ergänzt war.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)